この添付文書をよく読んでから使用すること。

体外診断用医薬品

承認番号 20900AMZ00075000
日本標準商品分類番号 877449

＊＊2012年４月改訂（問い合わせ先名称の変更等）
＊2011年４月改訂（製造販売元の社名変更）

PIVKA-Ⅱキット
血中PIVKA-Ⅱ測定用医薬品
エイテスト® PIVKA-Ⅱ
Eitest® PIVKA-Ⅱ
（カップ型酵素免疫測定法）

【全般的な注意】

1．本製品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないこと。
2．診断に際しては、臨床症状や、他の検査の結果などを合わせて総合的に判断すること。
3．本製品は肝細胞癌の腫瘍マーカーであり、肝細胞癌の診断補助として用いる。したがって、本製品の測定値だけから肝細胞癌の確定診断はできない。
4．ビタミンK剤の投与により、PIVKA-Ⅱ量が減少することがあるので注意をすること。
5．ビタミンK括抗剤（ワルファリン）及び抗生物質の投与により、PIVKA-Ⅱ量の上昇があるので注意すること。
6．添付文書以外の使用方法については保証をしない。
7．本キットの標準抗原にはヒト由来成分が含まれており、HBs抗原、HCV抗体及びHIV抗体陰性であることを確認しているが、感染の危険があるので感染性のあるものとして取り扱うこと。
8．使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用すること。
9．全操作を熟知した後に測定を行うこと。
10．標準抗原、検体希釈液、反応用溶液及び反応停止液にはアジ化ナトリウムが含まれている。また、酵素基質には過酸化水素が含まれている。誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けること。

【形状・構造等(キットの構成)】

試　薬　名	内　容・性　状	容　量	数　量
標準抗原	脱炭酸プロトロンビン（凍結乾燥品）	10mAU、25mAU、500mAU、2000mAU/mL（溶解後）	各１本
検体希釈液	ウシ血清アルブミン液	3 mL/バイアル	１本
抗体コートカップ	ポリスチレン製カップの内壁に抗PIVKA-Ⅱマウスモノクローナル抗体をコートした透明なマイクロカップ	（２×８穴）×６列（96カップ）	１包
反応用溶液	10%正常ウサギ血清を含む淡黄色の0.05mol/Lトリス-(ヒドロキシメチル)-アミノメタン緩衝液	4 mL/バイアル	１本
酵素標識抗体	ホースラディシュペルオキシダーゼ標識抗ヒトプロトロンビンウサギ抗体10～40 E.U./mLを含む淡黄色の液	15mL/バイアル	１本
酵素基質	日局オキシドール	0.5mL/バイアル	１本
発色剤	2,2'-アジノ－ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)（凍結乾燥品）	4 mL/バイアル（溶解後）	３本
反応停止液	透明な２mmol/Lアジ化ナトリウム液	15mL/バイアル	１本
洗浄液用原液	１%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートを含む0.9%食塩液	10mL/バイアル	１本

【使用目的】

血漿又は血清中の異常プロトロンビン（PIVKA-Ⅱ）量の測定

【測定原理】

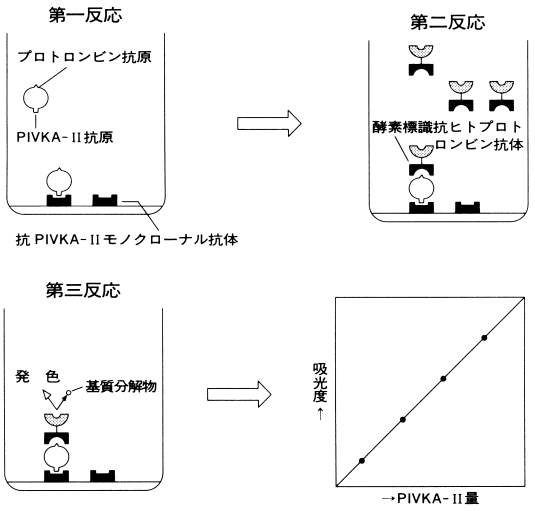
本キットはサンドイッチ方式による固相（カップ）型のEIA法を原理としている。固相化した抗PIVKA-Ⅱモノクローナル抗体を用いて、検体中のPIVKA-Ⅱと抗ヒトプロトロンビン抗体の酵素標識物を反応させる。さらに、基質液を加えて反応させると、基質液中の酵素基質が分解され、発色剤が発色する。この発色した液の吸光度から、検体中のPIVKA-Ⅱ量を測定する。

1．PIVKA-Ⅱの固相抗体との反応（第一反応）
抗PIVKA-Ⅱモノクローナル抗体をコートしたカップ内に検体を注入・反応させると、検体中のPIVKA-Ⅱはその量に応じてカップ内の固相抗体と結合する。

2．未反応物の除去と標識抗体との反応（第二反応）
次に未反応物を吸引除去し、カップ内を洗浄後、酵素標識抗ヒトプロトロンビン抗体を注入して反応させると、結合したPIVKA-Ⅱの量に応じた固相抗体－抗原－酵素標識抗プロトロンビン抗体から成るサンドイッチ結合物を形成する。

3．未反応酵素標識抗体の除去と発色反応（第三反応）
再度カップ内を洗浄し未反応酵素標識抗体を除去した後、基質液をカップ内に注入すると結合した酵素標識抗体により酵素基質が分解され発色剤が発色する。

4．測　定
固相に結合した酵素の活性は検体中のPIVKA-Ⅱ量を反映しているので、反応液の吸光度を測定し、その値を標準品の吸光度と対比することにより検体中のPIVKA-Ⅱ量を測定する。



【操作上の注意】

1．測定試料の性質、採取法
⑴検体には血漿又は血清を用いること。
⑵腐敗、変性等の保存状態の悪い検体は使用しないこと。
⑶検体は、よく混和した後に測定に用いること。特に凍結融解後の検体は、成分が均一になっていないことがあるので注意すること。

2．妨害物質の影響
⑴ヘモグロビンの影響
490mg/dLの濃度まで、何ら影響は認められなかった。(⑨)
⑵ビリルビンの影響
遊離型ビリルビンは27mg/dLの濃度まで、何ら影響は認められなか

った。また、抱合型ビリルビンは22mg/dL濃度まで、何ら影響は認められなかった。(⑨)

⑶乳びの影響

1950度まで、何ら影響は認められなかった。(⑨)

3．標準曲線は測定のつど、キット毎に二重測定(dupulicate)の平均値で作成すること。

4．ピペット類による秤量精度は測定精度に反映するので、器具の選定とその操作には十分注意すること。また、検体及び異なる試薬相互の汚染による誤差を防止するため、これらの注入にあたっては同一ピペット及び同一チップの使用は避けること。

5．抗体コートカップは、開封後速やかに使用すること。

6．抗体コートカップを分割使用する場合、封入チャック付アルミ袋は確実に封をすること。

7．本製品は用時調製を原則とする。開封、調製後の保存に際しては以下の注意をする。

⑴調製した標準抗原液は、栓をして2～10℃に保存し1カ月以内に使用すること。

⑵基質液は、調製後は速やかに使用すること。

8．酵素標識抗体に沈殿物が生じた場合は、よく撹拌して使用すること。

9．1キットを一度に使用する場合には、同一試薬は一つの容器中にまとめてから使用すること。また、製造番号が同一の複数のキットを一度に使用する場合も同様にすること。

10．カップ内をピペットで擦らないように注意すること。

11．酵素標識抗体をカップに注入する際、カップの周囲に付着しないように注意すること。

12．カップをカップホルダーに密着させ、反応温度と時間の管理に十分注意をすること。

【用法・用量(操作方法)】

1．試薬の調製方法

⑴標準抗原

各濃度の標準抗原1バイアルに精製水1mLを加えて溶解し、標準抗原液とする。調製後は2～10℃保存で1カ月間安定である。

⑵基質液

発色剤(凍結乾燥品)1バイアルに精製水4mLを加えて溶解し、酵素基質を10μL加え基質液を調製する。

調製後は速やかに使用し、残液は保存して使用しないこと。

⑶洗浄液

32カップ当たり0.9%食塩液(又は生理食塩液)300mLに洗浄液用原液3mLを加えて溶解して洗浄液とする。残液は保存して使用しないこと。

⑷そのまま用いる試薬

検体希釈液、抗体コートカップ、酵素標識抗体、反応用溶液及び反応停止液はそのまま用いる。

2．器具及び装置

⑴カップホルダー

抗体コートカップ外周部に密着嵌合する金属(アルミニウム)製ホルダー

⑵容　器

水分の蒸発を防ぐ容器

⑶カップ洗浄器具・装置

カップ内を洗浄するウエルウォッシャー。あるいは、1カップあたり250μLの洗浄液を注入できる器具とカップ内の液を吸引除去するためのアスピレーター。

⑷吸光度測定装置

EIA用マイクロプレートリーダー

⑸ピペット

10、25、100、200μL用マイクロピペット。1mL用ピペット。

3．操作方法

⑴抗体コートカップを取り出しカップホルダー内に挿入する。

⑵カップ内に反応用溶液を25μL注入する。

⑶各濃度の標準抗原液及び検体希釈液(ブランクとする)を100μLずつ各2カップに注入する。

⑷検体は1カップに100μL注入する。

⑸容器に入れ、2～10℃で16～24時間反応させる。(第一反応)

⑹カップ内溶液を除去後、カップ内を洗浄液で洗浄し、カップ内の液を十分除去する。

⑺すべてのカップに酵素標識抗体を100μLずつ注入する。(第二反応)

⑻容器に入れ、20～30℃で1時間反応させる。

⑼カップ内溶液を除去後、カップ内を洗浄液で洗浄し、カップ内の液を十分除去する。

⑽すべてのカップに基質液を100μLずつ注入する。

⑾容器に入れ20～30℃で反応させる。

⑿基質液を注入した10分後、プレートリーダーの波長405nmで標準抗原液500mAU/mL、2,000mAU/mL及び検体の吸光度を測定する。

⒀基質液を注入した60分後、すべてのカップ内に反応停止液を100μLずつ注入して反応を停止し、プレートリーダーの波長405nmで検体希釈液、標準抗原液10mAU/mL、25mAU/mL、500mAU/mL及び検体の吸光度を測定する。

⒁両対数グラフ用紙の横軸に標準抗原濃度500mAU/mL及び2,000mAU/mL、縦軸に10分測定で得られた標準抗原液500mAU/mL及び2,000mAU/mLそれぞれの吸光度(平均値)からブランクの吸光度(平均値)を減じた値で500mAU/mLから2,000mAU/mLの標準曲線を作成する。

⒂検体の10分測定で得られた吸光度からブランクの吸光度(平均値)を減じた値で、10分測定の標準曲線から検体中のPIVKA-Ⅱ量を定量する。

⒃両対数グラフ用紙の横軸に標準抗原濃度10mAU/mL、25mAU/mL及び500mAU/mL、縦軸に60分測定で得られた標準抗原液10mAU/mL、25mAU/mL及び500mAU/mLそれぞれの吸光度(平均値)からブランクの吸光度(平均値)を減じた値で10mAU/mLから500mAU/mLの標準曲線を作成する。

⒄検体の60分測定で得られた吸光度からブランクの吸光度(平均値)を減じた値で、60分測定の標準曲線から検体中のPIVKA-Ⅱ量を定量する。

(注)本キットを「全自動マイクロプレートEIA測定装置EP-one」等を用いて測定する場合は、当該機器の推奨測定条件に従い検査を実施する。

【測定結果の判定法】

1．健康成人の基準範囲の上限

健康成人273例について血清中のPIVKA-Ⅱ量を測定し、測定したPIVKA-Ⅱ量をBox-Coxべき乗変換処理をし、その数値から健康成人の基準範囲の上限を算定した結果、健康成人の基準範囲の上限は28mAU/mLであった。(⑧)

2．カットオフ値

肝細胞癌、肝硬変及び慢性肝炎患者血清中のPIVKA-Ⅱ量を測定し、その測定結果の感度、特異性及び正診率より判断して、カットオフ値は40mAU/mLとした。(⑧)

「判定上の注意」

持続飲酒しているアルコール性肝障害患者においては、PIVKA-Ⅱが陽性(カットオフ値以上)となることがあるので、注意すること。(⑩)

【臨床的意義】

PIVKA-Ⅱは血液凝固因子の第Ⅱ因子のPIVKA体であり、肝細胞癌で特異的に上昇するが、AFPとは相関がなく、診断においては相補的なマーカーである。PIVKA-Ⅱは肝細胞癌の診断及び治療効果判定のマーカーとして測定されており、さらに、再発の診断補助としてもその有用性が認められている。(①②③④⑤⑥)

本キットは酵素免疫測定法を原理とする血漿又は血清中のPIVKA-Ⅱ測定用医薬品であり、「エイテストモノP-Ⅱ」の改良キットである。主な改良点はスタンダードを脱炭酸プロトロンビンとウシ血清アルブミンに変更することにより標準抗原の固相抗体への非特異的吸着を低減させ、反応系におけるブランク値を低下させたことにある。その結果、既存品では測定できなかった低濃度領域(62.5mAU/mL以下)のPIVKA-Ⅱ量及び健康成人におけるPIVKA-Ⅱ量の定量が可能となった。(⑦)

本キットのカットオフ値(40mAU/mL)を用いて腫瘍径別陽性率の比較を行ったとき、腫瘍径30mm以下の小型肝細胞癌の陽性率は既存品に比べ約2.5倍向上した。(⑧)

よって、本キットは肝細胞癌の診断において画像診断などと合わせて肝細胞癌の補助診断として使用される。

【性　　能】

1．性　能

⑴感　度

標準抗原液10mAU/mL及び25mAU/mLを試料として試験を行うとき、得られる測定値(吸光度)と検体希釈液(0mAU/mL)の平均測定値(平均吸光度)の差は、標準抗原液10mAU/mLでは0.005以上、標準抗原液25mAU/mLでは0.013以上であった。

⑵正確性

管理用血漿を試料として測定を行うとき、得られた定量値は、既知濃度に対して80～120%であった。

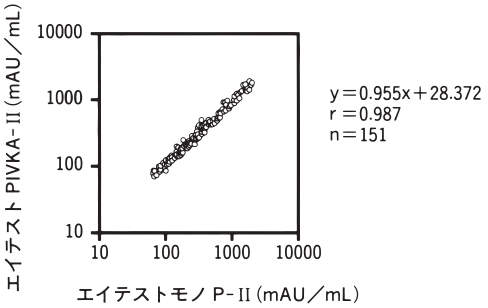
⑶同時再現性

標準抗原液25mAU/mL、500mAU/mL及び2,000mAU/mLを試料として、同時に4回測定を行うとき、変動係数(CV値)はいずれも10%以下であった。

⑷測定範囲
本キットの測定範囲は10～2,000mAU/mLであった。

2．臨床試験成績

⑴EIA法(エイテストモノP-Ⅱ)との相関
「エイテストモノP-Ⅱ」による測定値が62.5mAU/mL～2,000mAU/mLの肝細胞癌患者血清151検体を用いて本キットとの相関を検討した結果、相関係数r＝0.987、回帰式y＝0.955x＋28.372と良好な相関が得られた。(⑨)



⑵各種肝疾患における「エイテストPIVKA-Ⅱ」の陽性率
本キットにおける陽性率を検討した結果、肝細胞癌486例中251例(51.6%)、肝硬変324例中23例(7.1%)、慢性肝炎132例中10例(7.6%)が陽性であり、肝細胞癌に高い陽性率を示した。(⑧)

⑶肝細胞癌における腫瘍径別陽性率の比較
肝細胞癌で腫瘍サイズの明らかな258例の検体について、腫瘍径別の陽性率を本キットと「エイテストモノP-Ⅱ」で比較した結果、腫瘍径30mm以下の小型肝細胞癌での本キットの陽性率は、「エイテストモノP-Ⅱ」に比べて約2.5倍高かった。(⑧)

【使用上又は取扱い上の注意】

1．取扱い上(危険防止)の注意

⑴試料(検体)は、HIV、HBV、HCV等の感染の恐れがあるものとして取り扱うこと。

⑵検査にあたっては、感染の危険を避けるため、使い捨て手袋を着用し、マイクロピペット等の安全ピペットを使用すること。口によるピペッティングは行わないこと。

⑶試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けること。

2．使用上の注意

⑴本製品は凍結を避け、貯法に従い保存すること。凍結させた試薬は、品質が変化して正しい結果が得られないことがあるので、使用しないこと。

⑵使用期限を過ぎた試薬は使用しないこと。

⑶キット内の試薬は正確な反応が得られるように組み合わせてあるので、製造番号の異なる試薬を組み合わせて使用しないこと。また、同一の製造番号の試薬であっても、試薬を注ぎ足すことは行わないこと。

3．廃棄上の注意

⑴試料(検体)中にはHIV、HBV、HCV等の感染性のものが存在する場合があるので、廃液、使用済み器具などは次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度1,000ppm、1時間以上浸漬)又はグルタールアルデヒド(2%、1時間以上浸漬)による消毒処理あるいはオートクレーブ(121℃、20分以上)による滅菌処理を行うこと。

⑵試薬は保存剤として以下のとおりアジ化ナトリウムを含有している。アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性の強い金属アジドを生成することがあるので、廃棄の際は多量の水とともに流すこと。
標準抗原（溶解時)、検体希釈液及び反応用溶液：0.1w/v%
反応停止液：0.01w/v%

⑶装置使用による廃液は、各測定装置の廃棄物処理方法に基づいて処理すること。

⑷試薬及び器具等を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理すること。

【貯蔵方法、有効期間】

1．貯蔵方法
2～10℃の冷蔵庫に保存(凍結厳禁)

2．有効期間
1カ年。外箱又はラベルに表示の使用期限内に使用し、残液は保存して使用しないこと。

【包装単位】

エイテストPIVKA-Ⅱ …… 1箱(96回測定用)

【主要文献】

①Liebman H. A. et a1.：New. Engl. J. Med.　310,1427(1984)
②藤山重俊ら：肝胆膵　11,539(1985)
③藤山重俊：消化器科　5,55(1986)
④奥田博明ら：肝胆膵　14,759(1987)
⑤松木康彦ら：肝臓　28,1073(1987)
⑥服部　信：臨牀と研究　65,941(1988)
⑦渡辺啓祐ら：臨牀と研究　73,1476(1996)
⑧鈴木　宏ら：肝胆膵　33,1069(1996)
⑨高津和子：臨牀と研究　74,2137(1997)
⑩丸山勝也：The Medical & Test Journal　791,6(2001)

＊＊、＊【問い合わせ先】

エーディア株式会社　カスタマーサポートセンター　☎0120(921)207
FAX 03(3864)5644
エーザイ株式会社　お客様ホットライン　☎0120(419)497
FAX 03(3811)4946

【製造販売業者の名称及び住所】

＊製造販売元
エーディア株式会社
東京都千代田区岩本町1-10-6
☎03(3865)4311

販売提携
エーザイ株式会社
東京都文京区小石川4-6-10